

ラット全脳虚血モデルにおける脳内神経伝達アミノ酸とエネルギー代謝の動態及び相関に関する研究

著者	清水 宏明
号	2485
発行年	1993
URL	http://hdl.handle.net/10097/20827

氏 名（本籍） し みず ひろ あき
清 水 宏 明

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 2 4 8 5 号

学位授与年月日 平 成 5 年 2 月 24 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 61 年 3 月 25 日
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 ラット全脳虚血モデルにおける脳内神経伝達アミ
ノ酸とエネルギー代謝の動態及び相関に関する研
究

（主 査）

論文審査委員 教授 吉 本 高 志 教授 岩 崎 祐 三

教授 赤 池 紀 生

論文内容要旨

【序 論】

グルタミン酸は脳内における主要な興奮性伝達物質の一つであり、最近その虚血性神経細胞障害における役割が注目されている。細胞内グルタミン酸の細胞外放出機序として、細胞内 transmitter pool からのエネルギー及びカルシウム依存性放出と、metabolic pool からのエネルギー及びカルシウム非依存性放出とが、単離したシナプトソームを用いた実験により明かにされてきた。しかし、in vivo の病態においてこれら二つの機構がどのように関与するかはいまだ明らかでない。

【目 的】

本研究ではラット一過性全脳虚血モデルを用い、脳内エネルギー代謝及びグルタミン酸を含めた細胞外アミノ酸を経時的に測定し、虚血負荷により惹起されるグルタミン酸動態のエネルギー依存性につき検討することを目的とした。

【方 法】

ラット一過性全脳虚血は、全身麻酔、人工呼吸下に両側外頸及び翼突口蓋動脈、脳底動脈を電気凝固した後、両側総頸動脈を閉塞させることにより作成し、30分あるいは60分間の虚血後、再開通した。虚血前、中、後のエネルギー代謝は ^1H 及び ^{31}P 磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) により、経時的に5分から20分間隔で測定した (30分虚血群6匹, 60分虚血群6匹)。また、別群において、脳微小透析法と透析液の高速液体クロマトグラフィーにより、グルタミン酸、アスパラギン酸、ガンマアミノ酪酸、タウリン、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、グルタミンの各細胞外濃度を10分間隔で測定した (30分虚血群6匹, 60分虚血群6匹)。実験中、直腸温、血圧、血液ガスをモニターし、それぞれ生理的範囲となるよう調節した。

【結 果】

^{31}P MRS において、アデノシン三リン酸 (ATP) 及びリン酸クレアチン (PCr) は虚血後10分でほぼ枯渇し虚血中検出されなかった。無機リン酸 (P_i) は虚血後10分間急増、その後微増し虚血60分で虚血前値の $745 \pm 154\%$ (平均 \pm 標準誤差, 以下同様) となった。 P_i の PCr に対する化学シフト値から算出した細胞内 pH は、虚血前値の約7.12から虚血30分で 6.33 ± 0.11 、虚血60分で 6.36 ± 0.11 と低下した。 ^1H MRS において、乳酸/N-アセチルアスパラギン酸比は虚血後10

分間急増、以後30分まで微増しプラトーに達した（虚血前値 0.11 ± 0.02 ，虚血60分値 0.87 ± 0.09 ）。これらのエネルギー代謝は、再開通後、30分虚血群では60分以内にほぼ基礎値に復したが、60分虚血群における回復はより緩徐かつ不完全で、再開通120分後にも基礎値には戻らなかった。脳微小透析法で測定した細胞外グルタミン酸は、虚血開始後10分間微増、以後30分まで著増した。その後、非伝達物質アミノ酸と共に緩徐に増加し、60分虚血中には最高で基礎値（ $3.9 \pm 1.1 \mu\text{mol}$ ）の12倍（ $47.1 \pm 6.1 \mu\text{mol}$ ）となった。増加した細胞外グルタミン酸は、再開通後、いずれの群においても速やかに基礎値に復した。ガンマアミノ酪酸以外の他の神経伝達ないし修飾物質、すなわちアスパラギン酸、タウリン、グリシン、アラニンもほぼ同様の傾向であった。一方、非伝達物質であるセリン、スレオニンはやや遅れて虚血後30分より有意の増加を呈した。グルタミンは虚血中有意の変化を示さず、再開通後、一過性に低下した。

【考 察】

60分虚血中の細胞外グルタミン酸動態を、便宜的に三相に分けて考察した。第一相は虚血後10分間であり、高エネルギーリン酸はいまだ存在しているがエネルギー不全状態にある。したがってこの間の細胞外グルタミン酸増加は、transmitter poolに由来し、エネルギー及びカルシウム依存性放出が主体であると考えられた。また、観察された増加量が軽度であったことは、同poolの容量が小さいことのほか、エネルギー依存性再取り込みにより拮抗されるためと推測された。第二相は虚血10分から30分までであり、大量かつ急激なグルタミン酸増加がみられた。この主な機序として、エネルギー依存性再取り込み機構の不活化に加え、エネルギー枯渇により増強されたエネルギー及びカルシウム非依存性放出が考えられた。第三相は虚血30分以降であり、非神経伝達アミノ酸の増加をともなった細胞内アミノ酸の非特異的漏出が起これと考えられた。

一方、再開通後の回復に関して、エネルギー代謝の回復が30分虚血群に比べ60分虚血群において緩徐かつ不完全であったのに対し、グルタミン酸の回復はいずれの群でも同様に速やかであったことから、主に再開血中への洗い流しなどのエネルギー非依存性機序によると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、実験的脳虚血における細胞内アミノ酸、特にグルタミン酸の細胞外放出、蓄積機序について、エネルギー代謝の面から述べている。

グルタミン酸は脳内における主要な興奮性伝達物質の一つであり、細胞外高濃度グルタミン酸が細胞毒性を持つこと、脳虚血により細胞外グルタミン酸が著しく増加することなどから、最近、虚血性神経細胞障害を引き起こす原因の一つとして、グルタミン酸が注目されている。その細胞外放出機序に関して、エネルギー及びカルシウム依存性放出とエネルギー及びカルシウム非依存性放出の、少なくとも二つの機序があることが、培養神経細胞を用いた研究により、明らかにされている。

しかし、*in vivo*の脳虚血においてこれらの機序がどのように細胞外グルタミン酸増加に関わっているのかはまだ明らかでなく、本論文はこの点に関し検討することを目的としている。

本論文で用いられた磁気共鳴スペクトロスコピー及び脳微小透析という方法は、いずれも *in vivo* において一つの個体から経時的に計測可能であるという特徴を有しており、この目的に適していると考えられる。また、用いられた虚血モデルは、ラットにおいて再現性よく一時的完全脳虚血を作成できることが報告されている。

著者は、このような実験系、実験方法を用い、完全脳虚血直後10分間の細胞外グルタミン酸増加は主にエネルギー及びカルシウム依存性機序によること、虚血10分から30分のそれは主にエネルギー及びカルシウム非依存性機序によること、虚血30分以降は非神経伝達アミノ酸をも伴う非特異的漏出と考えられること等を示した。

このことは、従来混沌としていた *in vivo* における虚血性グルタミン酸放出機構のエネルギー依存性を明らかにした点で価値があるばかりでなく、脳虚血の薬物療法を考える場合に重要な示唆を与えられる。例えば、グルタミン酸拮抗剤がすでに動物実験において使用されているが、その中には、エネルギー及びカルシウム依存性放出を抑制するシナプス前拮抗剤や、高エネルギーリン酸が存在する場合にのみ拮抗作用を発揮するものなどがあるとされている。従って、本論文が指摘するように、虚血脳のエネルギー状態をふまえて薬物の種類、投与方法を検討する必要があると考えられる。

以上、虚血性グルタミン酸放出機構のエネルギー依存性に関する知見と今後の脳虚血の薬物療法に対する示唆を鑑み、本論文は学位授与に値するものと考えられる。